

UNIVERSITA' DI PISA

SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN

“SANITA' ANIMALE, ALLEVAMENTO E PRODUZIONI ZOOTECHNICHE”

Direttore Prof. Domenico Cerri

Tesi di specializzazione

Ricerca di Coxiella burnetii in campioni di latte di ovini e di bovini, presenti nel territorio della Valdera

SPECIALIZZANDO:

Nadia Baroni

RELATORE:

Prof.ssa Valentina Ebani

DIRETTORE:

Prof. Domenico Cerri

INDICE

INTRODUZIONE.....	pag.3
1.EZIOLOGIA.....	pag. 5
2.PATOGENESI.....	.pag. 8
3.EPIDEMIOLOGIA.....	.pag. 9
4. SINTOMATOLOGIA E LESIONI ANATOMO PATOLOGICHE.....	pag. 14
5.DIAGNOSI.....	pag. 16
6.PROFILASSI.....	pag. 22
7.CHEMIOPROFILASSI.....	pag. 23
8. VACCINOPROFILASSI	pag.24
9. RICERCHE PERSONALI.....	pag. 25
10.MATERIALE E METODICHE.....	pag. 26
11. RISULTATI.....	pag. 30
12. CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI.....	pag. 31
13. BIBLIOGRAFIA.....	pag. 33

INTRODUZIONE

In questi ultimi anni le abitudini alimentari hanno subito notevoli cambiamenti. Infatti se da un lato la vita moderna, i tempi frenetici e la scarsità di tempo per cucinare hanno consentito l'ampia diffusione di piatti pronti, cibi precotti, surgelati, refrigerati ecc., dall'altra si sta affacciando prepotentemente da parte del consumatore, il desiderio di un profondo cambiamento di stile di vita, un ritorno al naturale, con la creazione di gruppi d'acquisto solidale (G.A.S), l'acquisto di prodotti di filiera corta, che hanno favorito lo sviluppo di piccoli e medi caseifici aziendali e la diffusione su territorio di distributori di latte crudo. Viste le peculiari caratteristiche di *Coxiella burnetii*, sia dal punto di vista eziologico che patogenetico, la facilità di trasmissione per aerosol e per via alimentare attraverso il latte crudo, non possiamo non chiederci se la Febbre Q non possa costituire un rischio per la salute pubblica e non considerarla esclusivamente una malattia professionale, limitata ad alcune categorie di persone, che stanno a stretto contatto con gli animali (allevatori, veterinari, addetti ai macelli, ecc.)

Tale domanda è giustificata dall'incremento di epidemie fra il bestiame e i numerosi casi umani, come dimostra quanto accaduto negli ultimi anni in Olanda, dove fra il 2009 e 2010, ben 75 allevamenti ovi-caprini risultarono positivi per coxiellosi, e ben 41.000 capi furono abbattuti. Al contempo venivano registrati oltre 3000 casi umani, con circa 600 ricoveri in ospedale per gravi forme polmonari (4). Gli stessi bollettini epidemiologici indicano la diffusione di tale patologia e l'incremento dei casi. Alcuni dati preliminari segnalano che nel corso del 2007 sono stati notificati 585 casi umani

e che nel 2008 erano quasi triplicati (1594). Dati che sicuramente non rispecchiano la situazione reale, poiché la malattia ha una sintomatologia aspecifica, spesso confondibile con una sindrome influenzale, pertanto non diagnosticata.

Si sottolinea che questa zoonosi non è inserita nell'elenco dell'allegato I della Direttiva CE 99/2003 (Misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici, recante modifica della decisione 90/424/CEE del Consiglio e che abroga la direttiva 92/117/CEE del Consiglio), e che al momento non sono presenti norme comunitarie uniche in materia di notifica, monitoraggio e diagnosi di Febbre Q negli animali domestici. In Italia la Febbre Q è contemplata nel Regolamento di Polizia Veterinaria (D.P.R. n. 320/54) che prevede l'adozione di misure igienico-sanitarie e controllo sierologici periodici, fino all'estinzione del focolaio. Anche nel caso di malattia diagnosticata in umana non esiste una normativa in ambito comunitario, visto che in alcuni stati europei come la Francia, il Belgio, la Spagna e l'Ucraina, non è prevista neanche la denuncia.

1. EZIOLOGIA

Burnet (1937) e Cox nel 1939 isolarono per la prima volta un germe che classificarono come appartenente all'ordine *Rickettsiales*, famiglia *Rickettsiaceae*, tribù *rickettsiae*, genere *Coxiella*, specie *Coxiella burnetii*.

L'avvento della biologia molecolare e studi filogenetici sulle sequenze genetiche, hanno evidenziato che in realtà *Coxiella* appartiene all'ordine *Legionellales*, famiglia *Coxiellaceae*, genere *Coxiella*.

Si presenta come un piccolo batterio immobile, pleomorfo (forme coccoidi e bacilliformi), parassita intracellulare obbligato, penetra nella cellula ospite tramite fagocitosi. La successiva fusione fagosoma-lisosoma non impedisce la riproduzione del batterio, con la liberazione di progenie dapprima nel citoplasma cellulare e poi all'esterno. Delle dimensioni di 0,2-0,4 x 0,5-1 µm, presenta struttura e composizione simile ai Gram-negativi. Mostra un complesso ciclo intracellulare, che porta alla formazione di forme simili a spore (spora- like) responsabili della sopravvivenza in ambiente esterno per lunghi periodi.

L'osservazione al microscopio elettronico di cellule infette evidenzia la presenza di due forme morfologicamente distinte. Queste due varianti in funzione delle dimensioni sono indicate con la sigla LCV "large cells variants", metabolicamente attiva e SCV "small cells variants", metabolicamente inattiva. Quest'ultima derivante dallo spazio periplasmatico delle LCV, attraverso un processo simile alla sporulazione. La forma SCV è molto resistente sia all'essiccamento che agli agenti

chimico-fisici fra i quali i comuni disinfettanti, ciò favorisce la sua persistenza nell'ambiente. (5,11,13)

Anche dal punto di vista antigenico *C. burnetii* presenta due distinte strutture, indicate con il nome di Fasi.

La Fase I, assimilabile alla fase liscia di alcune specie batteriche, è quella che si riscontra comunemente in natura, più virulenta, immunogena e caratterizzata da un LPS lungo ed evolve in Fase II, con LPS corto, solo dopo molti passaggi su sacco vitellino di uova embrionate di pollo o su colture cellulari. L'infezione naturale avviene con gli stipiti in Fase I, che velocemente stimolano la comparsa di anticorpi attivi anche nei confronti degli stipiti in Fase II. Benché gli stipiti *C. burnetii* in fase II siano degli artefatti di laboratorio, ciò si rileva particolarmente utile per la diagnostica, in quanto i primi anticorpi ad essere prodotti sono quelli attivi verso la Fase II, pertanto la presenza o meno di anticorpi attivi nei confronti di una o entrambe le fasi, permette di valutare se l'infezione è in fase acuta o cronica. (11)

I recenti studi hanno individuato sei gruppi genetici, differenziabili in base a specifici patotipi. I gruppi da I a III sono stati isolati da zecche, nel latte vaccino, materiale abortivo di ruminanti e in alcuni casi di Febbre Q nell'uomo. I gruppi IV e V sono stati associati ad aborti negli animali e a forme croniche di endocardite ed epatite nell'uomo. Il gruppo VI è stato isolato nei roditori. (5)

Grazie alla sua forma resistente *C. burnetii* ha un'elevata stabilità fuori dall'ospite:

- resiste alle basse temperature, sopravvive a 4°C e a – 20 °C per almeno quattro mesi;

- sopravvive nel burro 41 giorni e nei formaggi fino a 25 giorni;
- resiste nel latte a 65 °C per trenta minuti, a 78 °C per 32 secondi e a 83 °C per 2 secondi;
- può sopravvivere per oltre 500 giorni nel materiale essiccato (pelli, lana, polveri), nelle feci delle zecche e 186 gg nel sangue disidratato. (21)

2. PATOGENESI

Coxiella burnetii è un batterio intracellulare obbligato, che penetra all'interno della cellule, in particolare macrofagi e monociti attraverso il meccanismo di fagocitosi.

Tale meccanismo presenta delle differenze, esso infatti è molto più efficiente nei confronti del batterio in Fase II, avirulento, rispetto a quello in Fase I, virulento. Tale differenza sembra legata al fatto che per il batterio in Fase I, l'attacco è mediato dall'integrina $\alpha v \beta 3$, mentre in Fase II, oltre all'integrina viene coinvolto il recettore C3 del complemento, che favorirebbe una più veloce e miglior replicazione del microorganismo all'interno della cellula. Sebbene la coxiella presenti caratteri generali tipici di tutte le altre rickettsie, tuttavia si differenzia per la sua capacità di replicazione all'interno del fagolisosoma il cui pH acido sembra favorire non solo il metabolismo batterico, ma offrire anche una protezione nei confronti dell'attività battericida di numerosi antibiotici.

In Fase I la captazione del microorganismo sembra favorita anche dal TRL 4 (Toll-like receptor 4), che determina inoltre la produzione di citochine. Nel meccanismo è coinvolto anche il TRL 2 che stimola la produzione di IFN- γ (γ -Interferon) e di TNF (Tumor necrosis factor).

Il primo provoca l'apoptosi dei macrofagi con esposizione del TNF di membrana che stimola la fagocitosi e la produzione di prostaglandine lipidiche infiammatorie

In seguito all'infezione si osserva la produzione di specifiche immunoglobuline. I vari studi hanno messo in evidenza che la Fase I stimola soltanto la produzione di Ig M, mentre la fase II stimola sia le IgM che IgG. (5)

3. EPIDEMIOLOGIA

L'infezione da *C. burnetii* è endemica nei ruminanti domestici, nella maggior parte degli stati europei. Bovini, capre, ovini, animali selvatici, uccelli costituiscono il serbatoio naturale dell'infezione che viene trasmessa all'uomo principalmente per aerosol contaminati, in seguito a contatto diretto con gli animali infetti, con le pelli, con la lana, con prodotti del parto, aborti, lochiazioni, placenta, e latte. Anche i cani e i gatti presenti negli allevamenti possono infettarsi in seguito ad ingestione delle placente costituendo un ulteriore serbatoio dell'infezione. Nel gatto inoltre è stato osservato che pur non presentando nessun sintomo anche in presenza d'infezione, può eliminare il microrganismo durante il parto.

C. burnetii è in grado d'infettare anche un'ampia varietà di artropodi, e fra questi la zecca rappresenta il vettore più importante per la trasmissione della malattia agli animali selvatici (ciclo animali selvatici- zecche) rappresentando anche una via di trasmissione occasionale per l'uomo. Il batterio è stato isolato in ben 40 specie di zecche, sia molli che dure. Fra queste in particolare quelle del genere *Dermatocentor*, *Ixodes* e *Rhipicephalus* (15). In questi artropodi dopo il pasto di sangue il batterio si moltiplica nelle cellule del celoma, delle ghiandole salivari e delle cellule intestinali. Inoltre possono fungere da *reservoir* poiché l'infezione si estende alle ovaie, garantendo la trasmissione alle generazioni successive. Le zecche eliminano una notevole quantità di coxielle con le feci che durante il pasto di sangue, imbrattano sia il mantello dell'ospite che l'ambiente.(6,15,17)

La presenza di selvatici infetti in ambienti condivisi con animali domestici, aree di pascolo, abbeverata, e elevate concentrazioni di zecche, come principale vettore, può condizionare l'epidemiologia della malattia negli allevamenti. Di conseguenza nell'uomo la patologia può essere condizionata dalla presenza di selvatici, che possono determinare un contagio sia diretto che indiretto (contagio degli animali domestici). (15)

Ciclo urbano



(liquido amniotico, placenta, escreti, aerosol)

Alimenti, lana, pelli

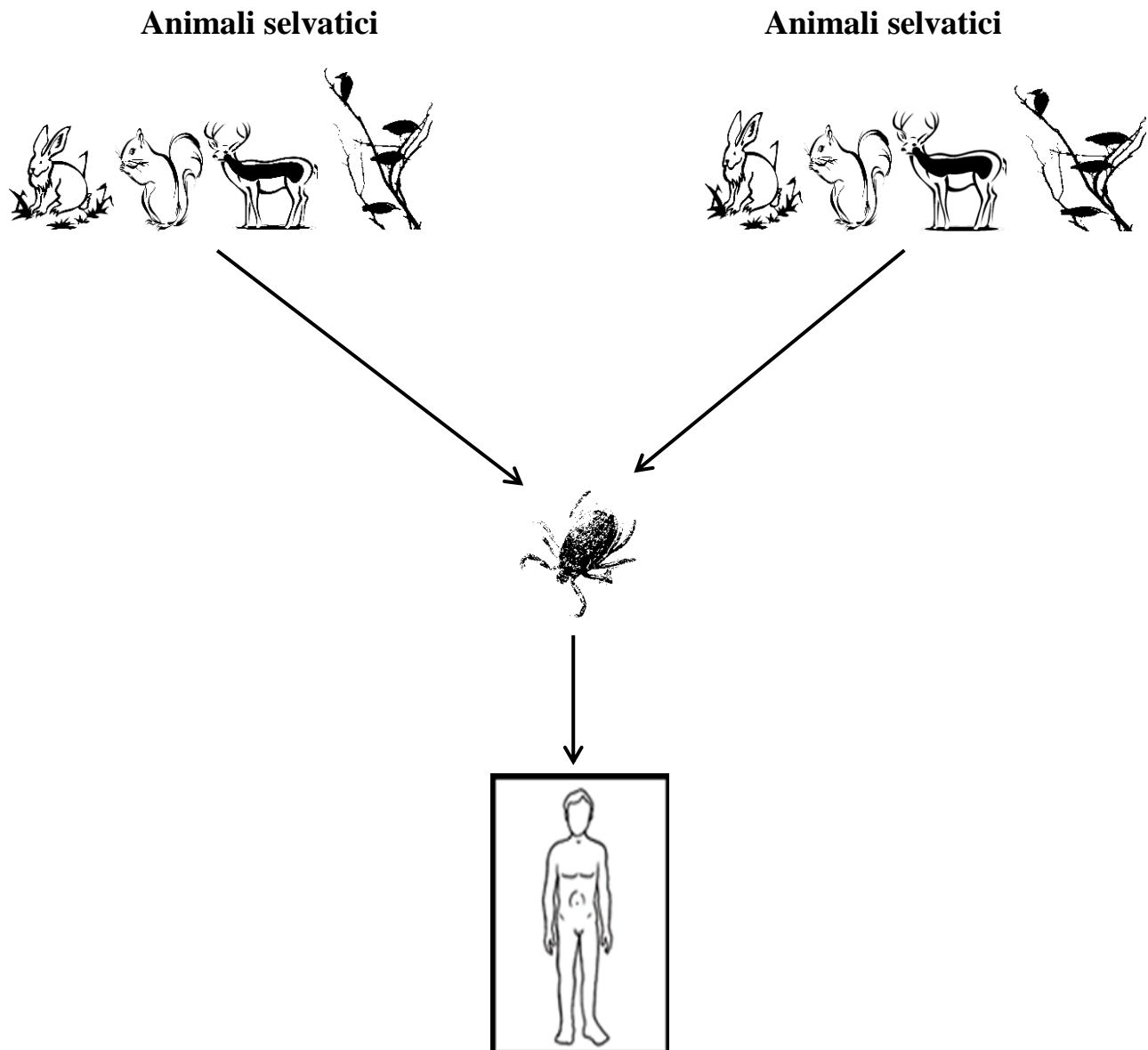


Animali recettivi



Ambiente

Ciclo silvestre



Sebbene la via inalatoria sia da sempre considerata la via di contagio più frequente nell'uomo, e quella alimentare la via d'elezione per gli animali, vista la facilità con cui possono ingerire alimenti e acqua contaminati con deiezioni, urine, ecc., in questi ultimi anni le ricerche svolte sul territorio italiano, mettono in evidenza come anche gli alimenti, soprattutto il latte crudo, possano costituire un veicolo d'infezione

per l'uomo/consumatore. Infatti ricerche svolte da vari IZS per valutare la presenza di microrganismi emergenti o riemergenti mettono in evidenza la presenza di *C. burnetti* con percentuali non del tutto trascurabili. (2,3,12)

Nella tabella si riportano risultati ottenuti durante l'indagini conoscitive.

Tabella 1- Monitoraggi per *Coxiella burnetii* sul latte crudo prelevato direttamente ai distributori

	Numero di campioni controllati	Arco temporale	Metodo diagnostico	% positività
IZS Piemonte, Liguria, Valle D'Aosta e facoltà di M.Veterinaria di Torino	236	2008-2010	PCR Real- Time	40,7
IZS Lombardia, Emilia romagna	3761*	2007-2008	PCR e PCR Real- Time	44,0

* controllo effettuato su tutti i distributori di latte crudo

4. SINTOMATOLOGIA E LESIONI ANATOMO PATOLOGICHE

Nell'uomo i sintomi compaiono dopo un periodo di incubazione che varia fra i 14 e i 26 giorni. Le manifestazioni cliniche, caratterizzate da brividi, cefalea, malessere, sudorazione intensa, febbre, tosse, dolori toracici, sono poco specifiche e facilmente sovrapponibili ad una sindrome influenzale. Le polmoniti atipiche sono tra le più comuni manifestazioni acute dell'infezione, così come l'epatite, accompagnata da epatomegalia, granulomi e febbre prolungata. Le forme croniche sono caratterizzate soprattutto da endocarditi. (5)

Negli animali la Febbre Q è quasi sempre asintomatica. Nei bovini l'unica manifestazione di un certo rilievo è l'aborto. Possiamo osservare, anche ipofertilità, metrite e nascita di soggetti prematuri. Gli animali infetti eliminano coxielle prevalentemente con le lochiazioni, ma anche con le feci, urine e latte. Attraverso il latte l'escrezione può durare parecchio tempo, fino a 32 mesi. L'eliminazione di coxielle nel latte non si accompagna a sintomi di mastite e spesso non sono interessati tutti i quarti, e benché la via discendente sia la modalità d'infezione più frequente, il batterio può colpire la mammella anche per via ascendente, per contatto con feci e paglia contaminata. In questo caso l'infezione sovente resta localizzata, senza generalizzare. Pertanto potremmo trovarci di fronte ad animali eliminatori di coxielle ma sieronegativi, per mancata formazione di anticorpi. Dal punto di vista anatomopatologico non si osservano alterazioni del tessuto mammario, e l'esame istologico del tessuto previa colorazione mette in evidenza la localizzazione delle

coxielle prevalentemente a livello interstiziale, soprattutto in quello interalveolare.

Anche il latte non presenta alterazioni quanti e qualitative, non si osservano infatti cali produttivi, variazioni del pH, aumento delle cellule somatiche ecc. (16)

Così come i bovini anche gli ovi-caprini i principali sintomi, in caso d'infezione e comunque poco specifici, sono aborto e parti prematuri. L'eliminazione del batterio negli allevamenti infetti avviene tramite il muco vaginale, feci e latte. Studi recenti hanno messo in evidenza la presenza di *C.burnetii* anche nelle nostre bufale, dove determina disordini riproduttivi, aborto e mortalità neonatale. Dato evidenziato da una recente ricerca condotta dall'IZS del Mezzogiorno, nella quale su 378 campioni esaminati (aborti e nati morti) ben 84 risultarono positivi per *C. burnetii*. (14)

5 DIAGNOSI

Le metodologie diagnostiche sono indicate nel manuale operativo dell'O.I.E. (Organizzazione mondiale della sanità animale), che vista l'estrema virulenza di *C. burnetti*, sottolinea che la manipolazione del materiale infetto venga effettuato da personale adeguatamente formato e in idonei laboratori conformi per il contenimento di patogeni classificati nel gruppo III.

La diagnosi può essere sia diretta che indiretta.

5.1 Diagnosi diretta

I metodi diretti puntano all'isolamento e identificazione dell'agente infettivo. La presenza del microrganismo può essere evidenziata con:

- **l'esame microscopico** di strisci colorati su materiale patologico (placenta, scoli vaginali, latte, feci e tessuti dei feti abortiti) tramite l'allestimento di vetrini per impronta, utilizzando la colorazione di Stamp, di Gimenez o di Macchiavello.
- **l'isolamento su uova embrionate di pollo e su colture cellulari** per indagini specifiche con inoculo diretto del campione o previa purificazione. Nel caso di campioni particolarmente inquinati è possibile inoculare direttamente cavie, ratti o topi, che vengono sierologicamente testati dopo 21 giorni. In quest'ultimo caso sono necessari laboratori con biocontenimento di tipo III.

Negli anni novanta Raolut e colleghi hanno messo a punto una tecnica di micro-colture cellulari adatte a tutti i patogeni endocellulari, inclusa coxiella.

Il metodo sviluppato per la diagnostica in umana ha dato dei buoni risultati anche nel settore veterinario, rappresentando una valida alternativa alle uova embrionate e agli animali da laboratorio, superando i problemi di costo e ma soprattutto quelli etici.

- **PCR**, metodo estremamente vantaggioso poiché altamente specifico e sensibile, consente di lavorare su diverse tipologie di campioni senza la necessità di isolare il batterio, poiché prevede l'estrazione del DNA dal campione e l'amplificazione di alcuni tratti del genoma. La sequenza target utilizzata per la PCR è la IS1111, ampiamente ripetuta nel genoma di *C. burnetii*. I recenti allestimenti di protocolli PCR real-time permettono non solo l'identificazione dell'agente ma anche la sua quantificazione in una matrice biologica. Ciò si dimostra utile nella diagnosi di aborto e consente inoltre di identificare i soggetti eliminatori.

5.2 Diagnosi indiretta

Si basa sull'evidenziazione di una risposta immunitaria nell'ospite. Fra i metodi indiretti da utilizzare su campioni di siero per la diagnosi di Febbre Q ricordiamo:

- **Fissazione del complemento**, metodo d'elezione, largamente utilizzato negli allevamenti, per fare diagnosi di screening. Ha il vantaggio di essere poco costoso, ma presenta dei limiti legati alla scarsa sensibilità, agli inconvenienti quando effettuata sui sieri emolitici o anticomplementari, fenomeno che si osserva con una certa frequenza nei sieri ovini.

- **Immunofluorescenza indiretta**, utilizzata per la diagnostica sierologica in umana. Trova impiego prevalentemente per la diagnosi individuale, visto il costo elevato e la non facile lettura dei vetrini.
- **ELISA**, ha buona specificità ed è più sensibile della fissazione del complemento e ha il vantaggio di essere utilizzabile anche su campioni di latte.

Questi metodi si dimostrano estremamente utili per lo screening nell'ambito degli allevamenti, ma hanno scarsa affidabilità a livello individuale, poiché l'interpretazione non è sempre chiara. Infatti sovente si osserva che animali ancora sieronegativi possono già eliminare coxielle, e che molti soggetti possono risultare, in seguito ad infezione acuta, sieropositivi per molti anni. Allo stato attuale i test diagnostici non sono in grado di discriminare fra animali vaccinati e quelli infetti in modo naturale. Recentemente test ELISA approntato con l'antigene utilizzato per la fissazione del complemento, ha dimostrato una maggior capacità di svelare la presenza di anticorpi prodotti in fase acuta, avendo la capacità di evidenziare la presenza di IgM. Questo consente una diagnosi precoce dell'infezione, anche su un singolo campione di siero.(5,15,18)

Dal punto di vista diagnostico possiamo considerare un allevamento infetto da Febbre Q quando riscontriamo *C. burnetii* nel siero degli animali, siamo in presenza di sintomi clinici (aborto, nascite premature) e di animali sieropositivi. Nelle tabelle che seguono vengono indicate le linee guida proposte dall'EFSA (Autorità Europea per la

Sicurezza Alimentare) per la corretta diagnosi di Febbre Q negli allevamenti bovini, bufalini e ovi-caprini.

Tabella 1- Linee guida EFSA bovini- bufalini

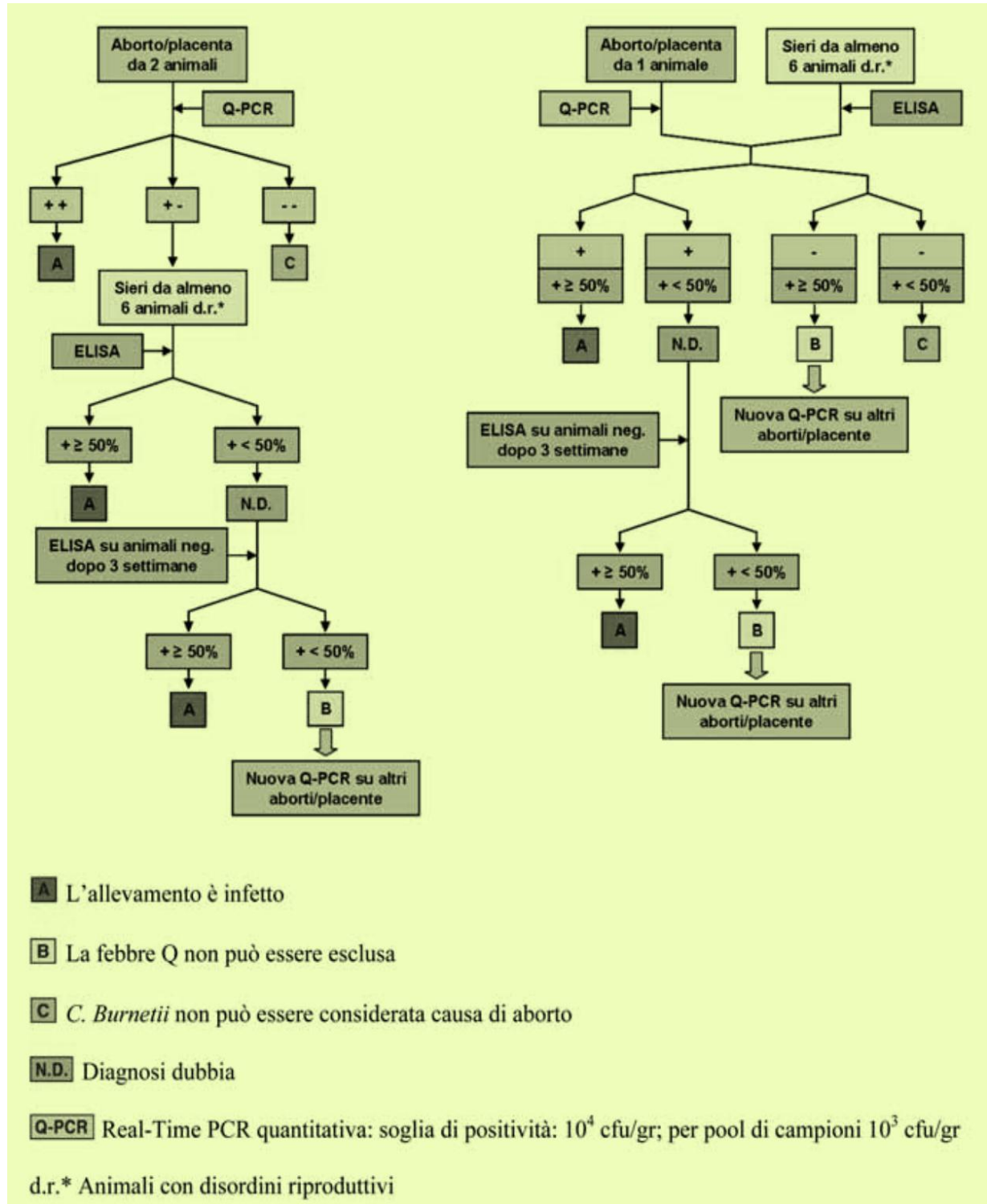
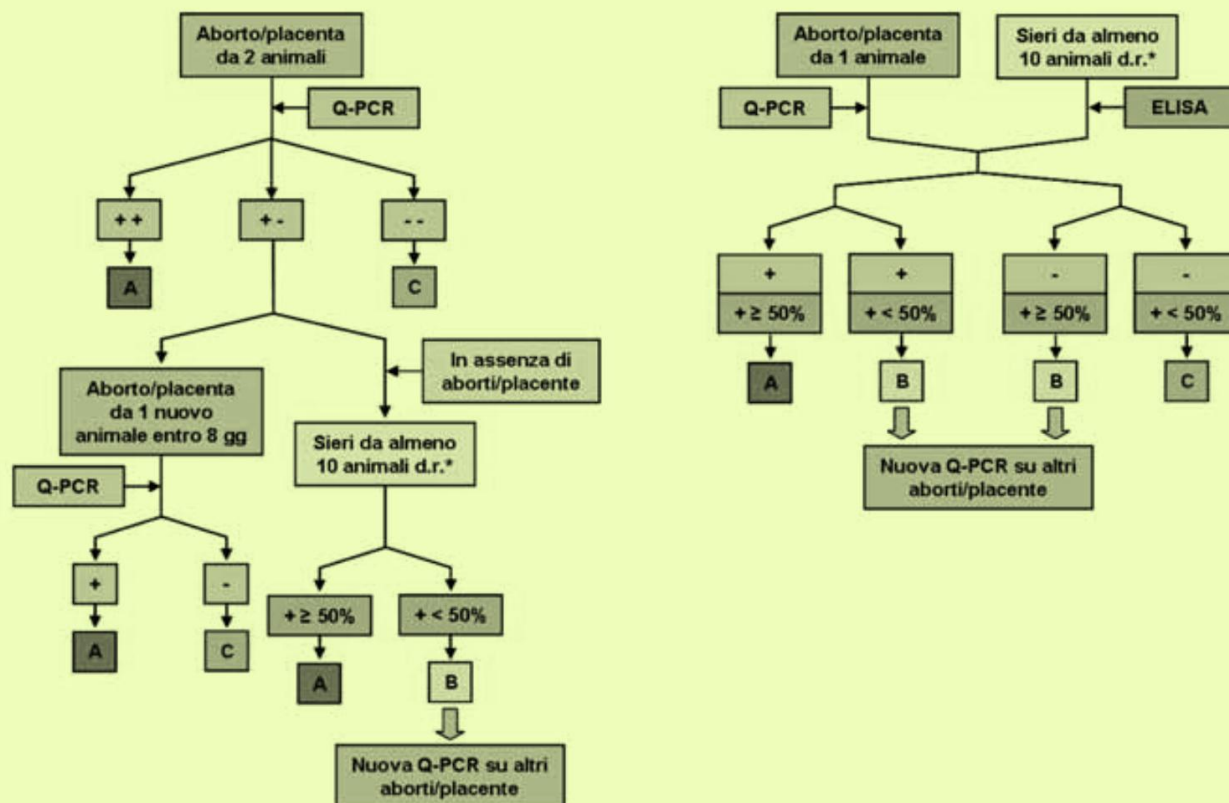


Tabella 2- Linee guida EFSA ovi-caprini



A L'allevamento/gregge è infetto

B La febbre Q non può essere esclusa

C *C. Burnetii* non può essere considerata causa di aborto

Q-PCR Real-Time PCR quantitativa: soglia di positività: 10^4 cfu/gr; per pool di campioni 10^3 cfu/gr

d.r.* Animali con disordini riproduttivi

6- PROFILASSI

Si riporta quanto previsto dal Regolamento di polizia veterinaria, D.P.R. 320/54, agli articoli 142 e 143

Art. 142 - *Accertati casi di Febbre Q nell'uomo, il sindaco, ai sensi dell'art. 10 del presente regolamento, adotta in tutto o in parte i seguenti provvedimenti nei riguardi degli animali che direttamente o indirettamente hanno avuto contatto con le persone ammalate:*

- a. identificazione dei soggetti infetti mediante prove sierologiche o allergiche;*
- b. isolamento degli animali che dagli accertamenti risultano infetti;*
- c. distruzione dei feti e degli invogli fetali;*
- d. accurata disinfezione dei ricoveri;*
- e. divieto di destinare all'alimentazione umana ed allattamento degli animali il latte proveniente dai soggetti infetti, se non previo trattamento risanatore;*
- f. divieto dell'ammissione al consumo dei latticini, anche se confezionati prima dell'accertamento della malattia, se non preparati con latte risanato sottoposti a stagionatura per almeno 30 giorni;*
- g. isolamento e cura oppure uccisione dei cani infetti;*
- h. trattamenti idonei per la lotta contro le zecche o altri vettori della malattia riscontrati nelle località infette.*

Art. 143 – *I provvedimenti sanitari disposti dal sindaco sono revocati, con le modalità stabilite dal primo comma dell'art. 16 del presente regolamento, quando*

successivi esami sierologico o allergici, da ripetersi a conveniente intervallo dagli ultimi risultati negativi, comprovano l'avvenuta estinzione della malattia.

Art. 16 comma 1- *quando il focolaio infettivo risulta estinto, cessate le cause che hanno determinato, i provvedimenti di cui agli art. 10 e 11 ed eseguite le prescrizioni di disinfezione, il sindaco su rapporto del veterinario comunale (veterinario ASL), provvede alla revoca dei provvedimenti stessi, secondo le prescrizioni stabilite per le singole malattie, stabilite nel Titolo II del presente regolamento.*(8)

7- CHEMIOPROFILASSI

Il trattamento terapeutico prevede l'utilizzo di tetracicline long-acting (ossitetraciclina) al dosaggio di 20mg/Kg, effettuando due trattamenti nell'ultimo mese di gravidanza. La terapia consente solo la riduzione dei numeri di aborti e dell'emissione di coxielle, pertanto non risolutiva, poiché non consente l'eradicazione della malattia e gli animali continuano ad eliminare il microrganismo anche se risultano clinicamente guariti. (5)

8- VACCINOPROFILASSI

In Italia al momento non esiste nessun vaccino registrato. Recentemente l'EMA (European Medicines Agency) ha approvato un vaccino registrato per bovini e caprini (Coxevac® CEVA) disponibile solo in alcuni paesi. Il vaccino riduce notevolmente l'incidenza degli aborti nella capra e l'eliminazione dell'agente nei ruminanti, ma non elimina il rischio di escrezione da parte di animali infetti. Pertanto è auspicabile vaccinare solo animali sierologicamente negativi. Il protocollo vaccinale prevede la somministrazione sottocutanea di due dosi a distanza di tre settimane e che il programma vaccinale sia completato 3 settimane prima dell'inseminazione artificiale o dell'accoppiamento, effettuando richiami annuali. Studi in vitro hanno dimostrato la maggior efficacia dei vaccini che impiegano la Fase I dell'agente rispetto alla Fase II. Al momento non sono disponibili vaccini marker. Questo potrebbe costituire un ostacolo nel discriminare fra animali vaccinati e quelli infetti in modo naturale.(7,10)

9- RICERCHE PERSONALI

La normativa (Reg. CE 853/04, Reg. CE 2073/05) non impone nessun tipo di controllo per la ricerca di *C. burnetii* nella matrice latte e nei suoi derivati (19). Inoltre come già sottolineato precedentemente è un patogeno raramente ricercato anche nell'ambito della sanità animale, se non solo nei casi di forte sospetto diagnostico. I recenti lavori svolti dall'IZS della Lombardia – Emilia Romagna, dall'IZS del Piemonte sul latte crudo mettono in evidenza percentuali di positività da *C. burnetii* piuttosto elevata, dal 40% al 47%. rappresentando un potenziale rischio per la salute pubblica (). Dato confermato da un'ulteriore ricerca effettuata dall'IZS del Mezzogiorno sulla prevalenza di *C. burnetii* nei formaggi ovi-caprini, bovini e bufalini prodotti in Italia meridionale. Dalla ricerca svolta emergeva che la prevalenza del microrganismo era del 40,4%, e fra i vari campioni analizzati (136) quelli a maggior positività risultavano essere i formaggi bovini (75%), seguiti da quelli ovi-caprini (49.9%) e in minor misura in quelli bufalini (23,9%). Si sottolinea inoltre che ben 30 dei formaggi analizzati erano prodotti artigianalmente con latte non pastorizzato, caratteristica che consente la sopravvivenza del microrganismo nel prodotto e una sua probabile trasmissione per via alimentare.(19)

Partendo dall'analisi di quanto esposto abbiamo voluto effettuare un'indagine sul latte prodotto negli allevamenti presenti sul nostro territorio, per valutare la presenza o meno di *C. burnetii*.

Per la nostra ricerca sono stati utilizzati 25 campioni di latte, di cui 19 di latte ovino e 6 di latte bovino. Il campionamento è stato fatto scegliendo sia allevamenti ovini, dove il latte viene conferito ai caseifici, che allevamenti ovini dove il latte viene trasformato nei caseifici aziendali, e allevamenti bovini dove il latte viene trasformato o utilizzato per la vendita diretta. La raccolta dei campioni è stata fatta al refrigeratore sul latte di massa di almeno quattro mungiture.

Gli esami sono stati eseguiti presso il Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi degli Alimenti della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Pisa.

10- MATERIALE E METODICHE

- Estrazione del DNA

I campioni di latte pervenuti al laboratorio sono stati sottoposti ad estrazione del DNA, mediante Dneasy tissue Kit (Quiagen).

Per ogni campione è stato eseguito il seguente protocollo:

1. centrifugare 10 ml di ogni campione a 3500 g per 30 minuti e raccogliere 100 µl di sedimento;
2. aggiungere 180 µl di un primo tampone di lisi Buffer ATL;
3. aggiungere 20 µl di Proteinase K, mescolare e incubare, per ottenere la lisi completa dei tessuti, a bagnomaria a 56 °C overnight;
4. mescolare con vortex per 15 secondi, aggiungere 200 µl del secondo tampone di lisi Buffer AL e 200 µl di etanolo (96-100%), mescolare per 15 secondi;
5. trasferire il campione trattato in una Dneasy spin column (DNsc) inserita in una provetta da 2 ml e centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto;
6. porre la DNsc in una nuova provetta da 2 ml e aggiungere 500 µl della prima soluzione di lavaggio (Buffer AW1), contenente il 56,8% di etanolo;
7. centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto;
8. trasferire la DNsc in una nuova provetta da 2 ml e aggiungere 500 µl della seconda soluzione di lavaggio (Buffer AW2), contenente il 69,76% di etanolo;
9. centrifugare a 12000 rpm per 3 minuti;

10. porre la DNsc in una microprovetta da 1,5 ml e aggiungere 200 µl della soluzione di eluizione (BufferAE);
11. incubare a temperatura ambiente per 1 minuto e poi centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto;

Il prodotto ottenuto che rappresenta l'eluato contenente DNA, viene conservato a 4 °C fino al momento delle esecuzione della PCR

- Polymerase chain reaction (PCR)

I campioni di DNA estratti sono stati sottoposti a PCR utilizzando i primer Trans-1 e Trans-2 che permettono l'amplificazione di un tratto di 687 bp del gene IS1111Q specifico per *Coxiella burnetii*.

L'amplificazione è stata condotta, per ciascun campione, su un volume di reazione di 25 µl, contenente 2 µl di DNA e 23 µl di master mix.

Quest'ultimo, a sua volta, è stato allestito secondo lo schema sotto riportato:

- | | |
|---------------------------------------|--------|
| • 10 x Qiagen PCR Buffer* | 2,5 µl |
| • Q solution | 5 µl |
| • dNTP (desossinucleotidi triptofano) | 200 µM |
| • Primer invF | 0,5 µM |
| • Primer invR | 0,5 µM |
| • Taq (Qiagen) | 1,25 U |

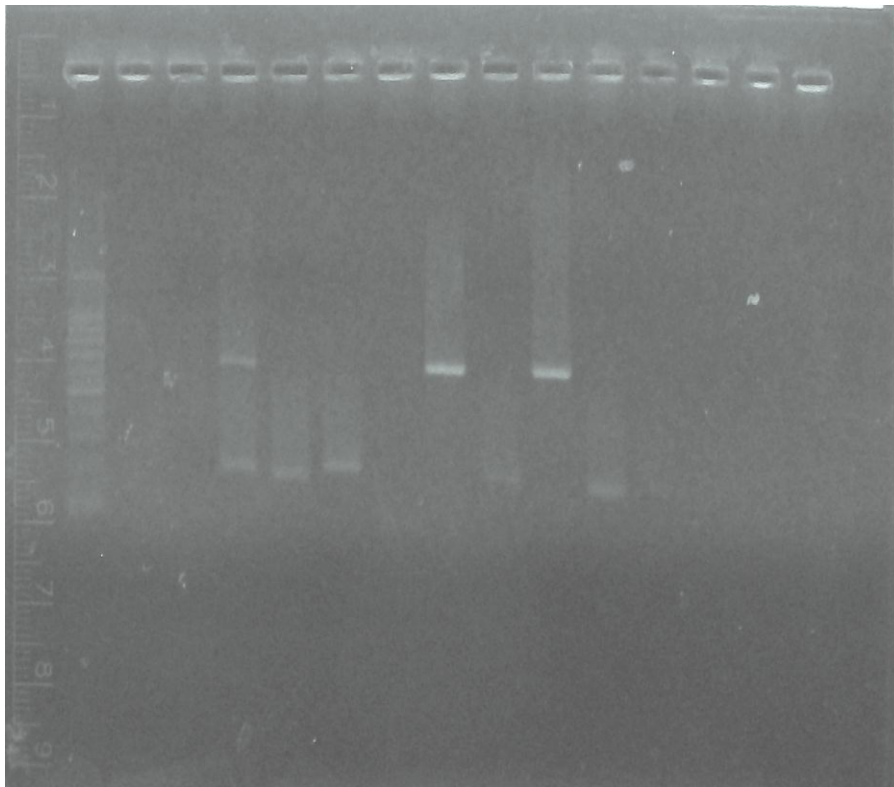
* contenente 15 mM di MgCl₂

La reazione è stata eseguita in termocicizzatore (Perkin Elmer, GenAmp PCR System 2700) programmato a 40 cicli, ciascuno di 30 secondi a 95°C, 1 minuto a 64°C, 1 minuto a 72°C. Il primo ciclo è stato preceduto da una iniziale denaturazione a 95°C per 10 minuti, mentre l'ultimo ciclo è stato seguito da una estensione finale a 72°C per 10 minuti. (1)

I prodotti dell'amplificazione sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1,5 % in TAE (Tris-acido acetico glaciale- EDTA) a 100V per 50 minuti. (1)

Il gel è stato colorato con bromuro di etidio, osservato ai raggi UV e fotografato.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



M: marker; linea 2, 6, 8: campioni positivi (687 bp)

11- RISULTATI

Dei 25 campioni sottoposti a PCR 3 sono risultati positivi, di cui 1 di latte bovino e 2 di latte ovino.

Tabella 3 - Numero e percentuale (%) dei campioni di latte testati risultati positivi

CAMPIONI DI LATTE	N.	POSITIVI	% POSITIVITA'
bovino	6	1	16,67
ovino	19	2	10,52
Totale campioni	25	3	12.00

12- CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti mettono in evidenza la presenza di *C. burnetii* nei nostri allevamenti.

Sebbene il risultato ottenuto sia poco rappresentativo, visto l'universo campionato (25 aziende con una positività del 12%), valore decisamente inferiore a quanto rilevato in altre regioni del territorio nazionale con campionamenti ben più estesi, si sottolinea che:

- ✓ i campionamenti sono stati effettuati nel distretto della Valdera della Asl 5 di Pisa, pertanto in un area limitata della provincia;
- ✓ nella scelta delle aziende si è data la precedenza a quelle che destinano il latte alla vendita diretta e alla trasformazione nei propri caseifici artigianali, dove i prodotti sono per lo più a base di latte crudo, oppure il trattamento termico non è tale da garantire l'inattivazione di *C. burnetii*, che ricordiamo avviene a temperature \geq a + 72 °C per almeno 32". Abbiamo rivolto, quindi, la nostra attenzione a quelle aziende che potevano costituire un rischio per il consumatore.

Alla luce dei risultati ottenuti, sarebbe interessante poter estendere la ricerca a tutto il territorio, per valutare la prevalenza di questa patologia sovente sottostimata.

Il monitoraggio, infatti, potrebbe porre le basi per la pianificazione di attività di controllo e profilassi mirata a contenere l'eventuale impatto economico e sanitario, nel settore sia zootecnico che umano, se la Febbre Q dovesse

diffondersi, come dimostrano i recenti focolai olandesi, che hanno comportato l'abbattimento di 41.000 capi e determinato 3000 casi umani con 600 ricoveri ospedalieri. Tale attività sarebbe auspicabile, inoltre, su tutti i territori degli stati europei, poiché ad oggi non esiste un vero e proprio sistema di sorveglianza europeo, e non vi sono norme comunitarie uniche in materia di notifica, monitoraggio e diagnosi di Febbre Q.

Quanto detto evidenzia come sia necessario uniformare fra i vari paesi la raccolta dei dati come indicato anche dall'EFSA per il quale «... *per individuare al meglio l'origine dell'epidemie nell'uomo e per mettere in atto, ove possibile, misure preventive, occorre un tempestivo scambio di informazioni tra veterinari e medici. Soprattutto, occorre che tutti si esprimano nella medesima lingua e registrino i dati nello stesso modo. L'armonizzazione della raccolta dei dati è essenziale per definire un quadro più preciso della situazione in Europa e per seguire la sua evoluzione nel tempo*». (9)

13- BIBLIOGRAFIA

- 1- **Berri M., Rekiki A. Boumedine K.S., Rodolakis A.** “*Simultaneous differential detection of *Clamydiophila abortus*, *Clamydiophila pecorum* and *Coxiella burnetii* from aborted ruminant’s clinical samples using multiplex PCR*”– BMC Microbiology 2009: 9-130
- 2- **Bertasi B., Maccabiani G., Tilola M., Daminelli P., Boni P.** “*Presenza di *Coxiella burnetii* e *mycobacterium paratuberculosis* nel latte crudo: monitoraggio mediante tecniche di biologia molecolare*” X Congresso Nazionale S.I. Di.L.V. ottobre 2008: 103-104
- 3- **Bianchi D.M., Gallina S., Fontana E., Civera T., Gennero S., Decastelli L.** “*Patogeni emergenti (*Coxiella burnetii*, *enterobacter sakazakii*, e *Mycobacterium paratuberculosis*) nel latte crudo dei distributori automatici*” 30 giorni-mensile del medico veterinario, ottobre 2010:8
- 4- **Bollettino Epidemiologico Nazionale Veterinario** “*Febbre Q*” aprile 2011, (3): 6-9
- 5- **Borriello G., Iovane G., Galliero G.** “*La febbre Q negli animali domestici*” – Large Animal Review 2010; 16: 273-283
- 6- **Calza L., Manfredi R., Chiodo F.** “*Febbre Q*” Recenti progressi in medicina settembre 2004; 94 (9): 409-410
- 7- **Coxevac® CEVA** “*Allegato I caratteristiche del prodotto*”: 3-4
- 8- **D.P.R n. 320/54:** Regolamento di Polizia Veterinaria: 696-697
- 9- **EFSA news** “*Parere scientifico su Febbre Q*” 22 giugno 2010: 14-15

- 10- **European Medicines Agency** “*Coxevax, vaccino inattivato per *Coxiella burnetii**”:1-4
- 11- **Farina R. Scatozzo F.**, “*Malattie infettive degli animali*” Utet 1998, 464-467
- 12- **Gallina S., Bianchi D.M., Fontana E., Gennero M.S., Dalmaso A., Civera T., Bottero M.T., Decastelli L.** “*Vendita diretta di latte crudo: valutazione di *E sakazakii*, *Coxiella burnetii* e *M. paratuberculosis* nell’esperienza piemontese*”- A.I.V.I. dicembre 2009 (6): 53-55
- 13- **Greco Grazia.** “*FEBBRE Q Malattia dei macellatori, •Zoonosi ri-emergente e fonti di infezione*” Vieste 26/6/12: 1-80
- 14- **Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno** “*Febbre Q e *Coxiella burnetii*, la bufala mediterranea tra ricerca, diagnosi e nuove strategie di lotta alle malattie*” Portici, novembre 2008
- 15- **Manuale Operativo OIE** capitolo 2-1-12
- 16- **Moretti B.** “*La febbre Q nei bovini con particolare riguardo alla colonizzazione di *Coxiella burnetii* nella mammella*”- Ann. Ist. Superiore Sanità, 1984;20 (4): 317-328
- 17- **Poli G., Cocilovo A.**, “*Microbiologia e immunologia veterinaria*” Utet 1996: 243-244
- 18- **Portale epidemiologico sanità pubblica**, www.epicentro.it
- 19- **Proroga Y.T.R., Casalnuovo F., Mancusi A., Gagliardi R., Rippa P., Damiani V., Squillaro D., Guarino A., Capuano F.** “*Studio preliminare sulla*

prevalenza di Coxiella burnetii in formaggi prodotti in Italia meridionale”- Italian Journal of Food Safety, 2011; 1 (2): 71-73

20- **Regolamento CE n. 853/04**: norme specifiche in materie di igiene per gli alimenti di origine animale.

21- **Stazzi P., Mirri A.** “ *Malattie infettive animali domestici*” 1956: 578-587